

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292113

研究課題名(和文) 真骨魚類の淡水・海水適応を担うイオン輸送体の解析

研究課題名(英文) Study of ion transporters involved in acclimation of teleost fishes to fresh water and seawater

研究代表者

加藤 明 (Kato, Akira)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号：40311336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,200,000円

研究成果の概要(和文)：真骨魚ゲノムには千を超える膜輸送体(輸送体、チャネル、ポンプ)がコードされている。それらの中にはエラ、腸、腎臓の上皮組織に発現し淡水や海水環境における浸透圧適応や体液ホメオスタシスを担う輸送体が含まれるが、*in vitro*における活性解析が詳細になされていないものが多い。本研究では、新骨魚類の淡水・海水適応に関わる重要なイオン輸送体の活性を電気生理学的な手法により明らかにすることで腎臓やエラの新たな分子機構を明らかにし、魚類生理学の教科書を正確に更新することを目指す。

研究成果の概要(英文)：The genome of teleost fishes encodes more than a thousand of membrane transport proteins such as transporters, channels, and pumps. Some of these transporters are expressed in the epithelia of the gill, intestine, and kidney and are responsible for the osmoregulation and the body-fluid homeostasis of teleost fishes in fresh water and seawater environments. However, the activities of these transporters are not well characterized *in vitro*. In the present study, we analyzed the function of these transporters by using electrophysiological techniques to clarify novel branchial and renal mechanisms for the freshwater and seawater acclimation.

研究分野：魚類生理学

キーワード：イオン輸送体 真骨魚 淡水順応 海水順応 水電解質代謝 上皮輸送 腎臓 比較生理学

1. 研究開始当初の背景

真骨魚の体液（細胞外液）に含まれるイオン組成や浸透圧は、ヒトの体液とほぼ同じレベルに維持されている。淡水魚は淡水中に含まれるわずかなイオンを濃度勾配に逆らって吸収し、また海水魚はエラや腎臓からイオンを積極的に排出することで、体液イオンの恒常性を維持している。濃度勾配に逆らったイオン輸送は魚類の淡水・海水適応に必須の能力であるが、その分子機序の多くは生理学上の open question となっている。

研究代表者らはこれまで、魚類で最初にゲノム配列が公開されたトラフグ（海水魚）とその近縁種で淡水・海水の両方で生息可能なメフグ、淡水魚のゼブラフィッシュなどをモデルに用い、真骨魚の淡水・海水適応を担う上皮輸送機構を解析してきた。ゲノム配列のベースにした網羅的な発現解析、エラ・腎臓・腸の組織・細胞レベルでの局在解析、およびイオン輸送体の電気生理学的な活性測定により、様々な成果を得た。海水メフグ腸における重炭酸輸送体の網羅的な発現解析から、飲水した海水中のカルシウムを炭酸塩として析出させる重炭酸輸送体を初めて同定した (Am J Physiol 294:R1402, 2008) (図 1)。海水魚は二価イオンを尿中に濃縮して排出するが、海水メフグ腎臓における網羅的な発現解析から、尿中に  $\text{SO}_4^{2-}$  や  $\text{Ca}^{2+}$  を分泌する輸送体の特定に初めて成功した (Am J Physiol 297:R1647, 2009; Am J Physiol 301:R1427, 2011)。 $\text{Mg}^{2+}$  輸送体の網羅的な解析から、尿細管細胞の細胞内液胞に局在する  $\text{Mg}^{2+}$  輸送体を同定し、transcytosis の関与を示した (Am J Physiol 305:R385, 2013)。

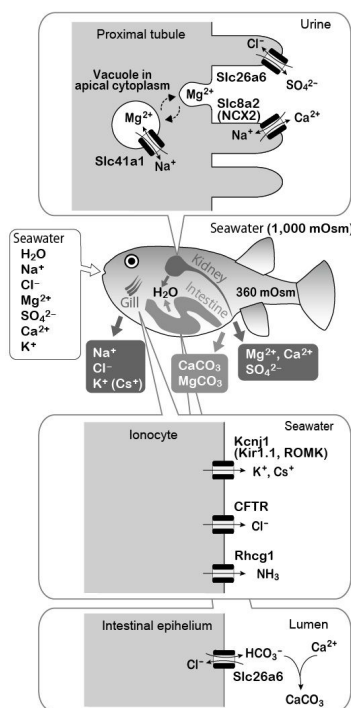


図 1 真骨魚の海水順応に関わる様々なイオン輸送体

淡水メフグを用いた腎臓に高発現する  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  共輸送体は海水メフグでは down regulation され、海水魚であるトラフグの腎臓には全く発現しないことから、腎臓における  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  共輸送体の発現が魚類の淡水順応に必須だという説を初めて提案した (Am J Physiol 300:R284, 2011)。淡水魚エラには体内のアンモニア排出と交換に淡水中の  $\text{Na}^+$  を取り込む仕組みが存在することが古くから提唱されてきたが、ゼブラフィッシュのエラに発現する  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  交換輸送体を初めて同定した (Am J Physiol 306:R315, 2014) (図 2)。エラ・腎臓・腸の上皮組織に発現する重要遺伝子は特定されつつあるが、魚類の淡水・海水順応におけるイオン輸送を担う分子・細胞レベルのメカニズムの多くは依然として未解明である。

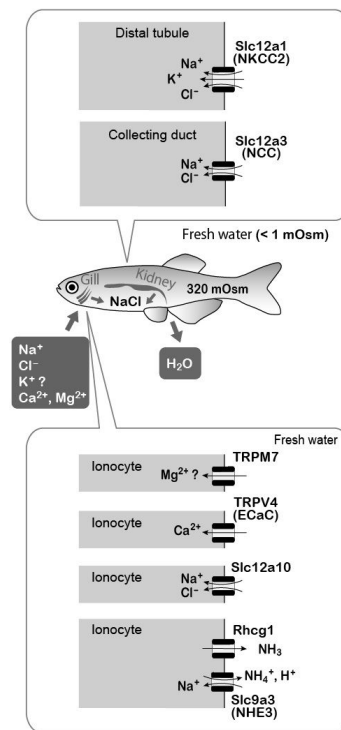


図 2 真骨魚の淡水順応に関わる様々なイオン輸送体

2. 研究の目的

本研究では魚類の淡水・海水順応を担う上皮輸送機構のうち、未解明で重要な open question の解明を試みた。特に淡水魚エラによる一価イオンの吸収、海水魚腎臓による二価イオンの排出に着目し、未解明の分子機序を明らかにすると共に、膜輸送体による未報告の新規活性の探索を目的とした。そのために、まず *Xenopus oocyte* に発現させた魚類の膜輸送体の活性を電気生理学的に測定する設備を構築して継続的な活性解析が可能となる研究拠点を形成し、膜輸送体の新たな解析手法の開発を試みた。

3. 研究の方法

現在、様々な真骨魚のゲノム配列が解読され、公開されている。そこで先ずトラフグ(海

水魚)やゼブラフィッシュ(淡水魚)を含む新骨魚ゲノムとヒトを含む四肢動物ゲノムとの比較ゲノム学、分子進化学的手法による解析により、膜輸送体遺伝子の構成と系統解析を整理した。それらの中から発現解析や免疫組織化学によりエラ・腎臓・腸に発現する重要遺伝子を選別した。

膜輸送体を over expression し、in vitro における活性を明らかにすることは、エラ・腎臓・腸における上皮輸送機構を解明するために必須である。そこで定常状態でのイオン輸送活性が低くかつ外来 cRNA の翻訳活性が高いアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いて、魚類に由来する膜輸送体の活性を電気生理学的手法により解析することを試みた。魚類に由来する膜輸送体の cDNA を PCR 法により増幅して pGEMHE ベクターに挿入してクローン化した後に、T7 RNA ポリメラーゼを用いて cRNA を合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に injection した。H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Mg<sup>2+</sup>などのイオノフォアを用いてイオン選択性微小電極を作製し、KCl 電極と共に卵母細胞に刺入し、それぞれの電位と培地の電位を差動型エレクトロメータ等により記録し、細胞内遊離イオン濃度と膜電位を測定した。基本培地から他のイオン濃度や浸透圧を変えずに H<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup>、Mg<sup>2+</sup>濃度を变化させた培地をそれぞれ作製し、培地交換に伴う細胞内イオン活性と膜電位の変化を記録した。

膜輸送体が起電性 (electrogenic) 輸送体か電気的中性 (electroneutral) 輸送体かを判定することは、膜輸送体が膜電位により駆動されるかどうか判断するために重要である。その判定のため、膜輸送体を発現させた卵母細胞の膜電流を二電極膜電位固定法により記録し、電流電圧特性を解析した。

研究代表者によるこれまでの研究では、電気生理学の実験は医学部の設備を利用して進められてきた。魚類生理学は医学やヒト生理学にも貢献することから共同研究が実現してきたが、限られた設備を本来の医学研究と共有する環境には一定の制約が存在した。本研究により国内に電気生理学の解析装置一式を新規購入することができた。この設備は魚類生理学を解析するための設備であり、制約なしに魚由来の膜輸送体の解析に用いることができる点で意義が大きく、研究の推進に大きく貢献した。世界的にもユニークな「魚類生理学研究のための電気生理学」の拠点を形成することができた。

#### 4. 研究成果

【1】海水魚腎臓の Mg<sup>2+</sup>排出を担う Mg<sup>2+</sup>輸送体の解析:細胞が細胞質から細胞外に Mg<sup>2+</sup>を汲み出す仕組みは生理学上の重要な question である。海水中には約 50 mM ものマグネシウムが含まれ、海水魚は腎臓の尿細管細胞から尿中に Mg<sup>2+</sup>を分泌して体液 Mg<sup>2+</sup>濃度を約 1 mM に維持するが、尿の Mg<sup>2+</sup>は約 150 mM にも達する。そこで海水魚の腎臓が

強い Mg<sup>2+</sup>排出活性を有することに着目し、分子機構の解析を行った。細菌の Mg<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>の排出に関与するとされる CorC のフグにおける相同タンパク質 (Cnm3 ファミリー) の解析から、海水飼育したフグ腎臓の近位尿細管細胞の細胞膜上に Cnm3 が強く発現することを見出した。Cnm3 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の細胞内総 Mg<sup>2+</sup>と遊離 Mg<sup>2+</sup>を ICP-MS 及び微小 Mg<sup>2+</sup>電極により測定したところ、優位な低下を観察した。二電極膜電位固定法 (two-electrode voltage clamp) からは Mg<sup>2+</sup>依存的な電流が観察されなかったことから、Cnm3 が電気的中性 (electroneutral) な Mg<sup>2+</sup>排出に関わる可能性が示唆され、海水魚腎臓による新しい Mg<sup>2+</sup>排出モデルを提案することができた (論文、)(図3)。

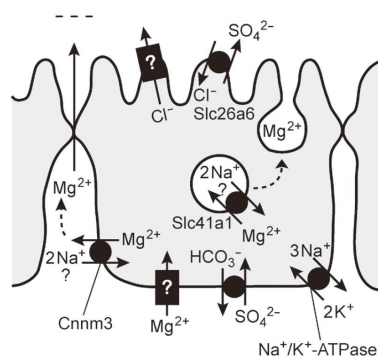


図3 海水魚近位尿細管による Mg<sup>2+</sup>排出の上皮モデル。

【2】吸収型 K<sup>+</sup>輸送体の同定:淡水魚のエラは体液の恒常性維持に必要なイオンを吸収する。Na<sup>+</sup>吸収を担うイオン輸送体の研究が進む一方、K<sup>+</sup>や Cs<sup>+</sup>の吸収メカニズムは明らかでない。ゼブラフィッシュエラに発現する膜輸送体の電気生理学的な活性解析の結果、細胞外 Na<sup>+</sup>の非存在下、細胞外 K<sup>+</sup>の上昇に伴う H<sup>+</sup>の efflux として K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体を同定した (図4)。このことは候補タンパク質が吸収型 K<sup>+</sup>輸送体であることを示唆しており、淡水魚エラによる K<sup>+</sup>吸収において中心的な役割を担うことが期待される。

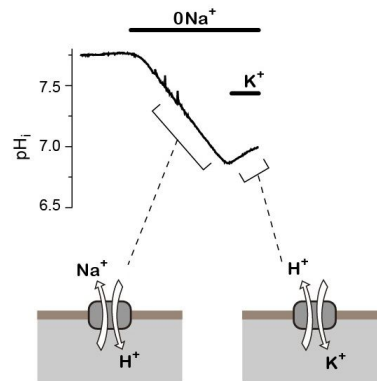


図4 アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体の活性

【3】新たな浸透圧調節機構の探索：グラスゴー大学、メイヨー医科大学のグループによりショウジョウバエの高塩濃度耐性に必要な因子が探索され、マルピーギ管に発現する陽イオン交換輸送体(Slc9)ファミリー-Slc9b1, Slc9b2の重要性が見出された。それら輸送体の活性は明らかになっておらず、また魚類を含む脊椎動物にも類似の分子機構が存在する可能性があることから、国際共同研究に参加して活性測定を行い、分子機序の解明を試みた。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、 $H^+$ 選択性微小電極、 $Na^+$ 選択性微小電極を用いた手法により活性を解析したところ、Slc9b2は期待通り $Na^+/H^+$ 交換輸送体として機能することを確認した。一方、Slc9b1は $H^+$ 輸送活性を示す一方で $Na^+$ を輸送せず、期待とは異なる活性を有することが明らかになった。 $Cl^-$ 選択性微小電極を用いた解析の結果、Slc9b1は強力な $H^+-Cl^-$ 共輸送活性を有することを見出した(論文)(図5)。Slc9ファミリーによる $Cl^-$ 輸送を示す報告としては初めての報告となり、この結果は魚類・哺乳動物のSlc9ファミリーの中にも $Cl^-$ 代謝を担う $Cl^-$ 輸送体が存在する可能性を示唆した(図6)。様々なSlc9ファミリーの発現ベクターを構築して $Cl^-$ 輸送体の特定を試みたが、現時点で $Cl^-$ 輸送体として機能するSlc9ファミリーは魚類・哺乳動物からは見つかっておらず、今後も探索を継続する。小胞グルタミン酸トランスポーターSlc17a7の細胞膜上での新機能を解析する国際共同研究に参加し、Slc17a7が細胞膜上の $Na^+/H^+$ 交換輸送体として機能することを明らかにした(論文)。このことはSlc9ファミリー以外にも細胞膜上で $Na^+/H^+$ 交換輸送活性を有する分子が存在することを示している。

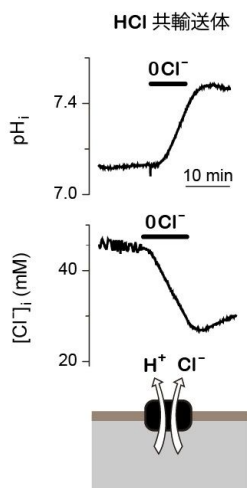


図5 アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた $H^+-Cl^-$ 共輸送体の活性

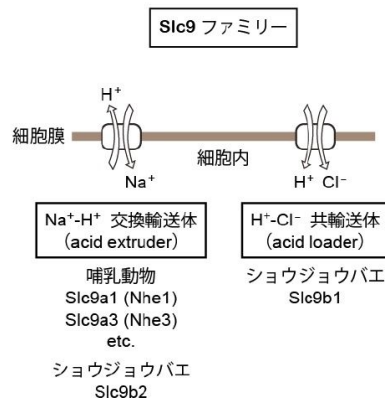


図6 Slc9ファミリーの新たな活性

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Rossano AJ, Kato A, Minard KI, Romero MF, Macleod GT.  $Na^+/H^+$ -exchange via the *Drosophila* vesicular glutamate transporter (DVGLUT) mediates activity-induced acid efflux from presynaptic terminals. *J. Physiol.* 595: 805-824, 2017. (査読有)  
DOI: 10.1113/JP273105.

Hasegawa K, Kato A, Watanabe T, Takagi W, Romero MF, Bell JD, Toop T, Donald JA, and Hyodo S. Sulfate transporters involved in sulfate secretion in the kidney are localized in the renal proximal tubule II of the elephant fish (*Callorhynchus milii*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 311: R66-78, 2016. (査読有)  
DOI: 10.1152/ajpregu.00477.2015.

Wong MK, Pipil S, Kato A, and Takei Y. Duplicated CFTR isoforms in eels diverged in regulatory structures and osmoregulatory functions. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 199: 130-141, 2016. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.06.018.

Chintapalli VR, Kato A, Henderson L, Hirata T, Woods DJ, Overend G, Davies SA, Romero MF, and Dow JA. Transport proteins NHA1 and NHA2 are essential for survival, but have distinct transport modalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112: 11720-11725, 2015. (査読有)  
DOI: 10.1073/pnas.1508031112.

Nag K, Sultana N, Kato A, Dranik A, Nakamura N, Kutsuzawa K, Hirose S, and Akaike T. Ligand-induced internalization, recycling, and resensitization of adrenomedullin receptors depend not on CLR or RAMP alone but on the receptor complex as a whole. *Gen. Comp.*



Endocrinol. 212: 156-162, 2015. (査読有)

DOI: 10.1016/j.ygcn.2014.04.029.

加藤 明 . マグネシウム恒常性を担うマグネシウムイオン輸送体の多様性 . 生化学 87: 727-732, 2015. (査読無)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2015.870727

Islam Z, Hayashi N, Inoue H, Umezawa T, Kimura Y, Doi H, Romero MF, Hirose S, and Kato A\*. (\*corresponding author)

Identification and lateral membrane localization of cyclin M3, likely to be involved in renal  $Mg^{2+}$  handling in seawater fish. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 307: R525-R537, 2014. (査読有)

DOI: 10.1152/ajpregu.00032.2014.

#### [学会発表](計5件)

Kato A, Suzuki Y. Gene expression analysis of osmoregulatory tissues in pufferfishes acclimated to fresh water, brackish water, and seawater. Advanced Genome Science International Symposium “The Start of New Genomics” (2017年1月10日, Tokyo, Japan)

Kato A. Diversity of magnesium transporters involved in magnesium homeostasis. 11th TOIN International symposium on Biomedical Engineering (2016年10月29日, Yokohama, Japan) (基調講演)

Zinia Islam, 林 菜穂子, Michael F. Romero, 広瀬 茂久, 加藤 明 . 海水魚腎臓に発現するマグネシウムイオン輸送体 . 日本動物学会第85回大会 (2014年9月11日, 仙台)

Kato A. Ion transporters in the kidney of euryhaline and seawater puffer fishes. 11th International Congress on the Biology of Fish (2014年8月4日, Edinburgh, UK) (招待講演)

加藤 明, 平田 拓, 伊藤 雄介, 広瀬 茂久, Michael F. Romero . アフリカツメガエル卵母細胞を用いた  $Na^+/NH_4^+$  交換輸送体の活性測定 . 第9回トランスポーター研究会年会 (2014年6月14日, 名古屋)

#### [その他]

ホームページ等

<http://kato.bio.titech.ac.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

加藤 明 (Kato, Akira)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・准教授

研究者番号: 40311336